

人ハブ																	
トグロ																	
ピン																	

表の見方に関する注意

- 販売名欄は、製造工程が同じ、同一販売名・規格違い製剤については、一つの販売名に集約して掲載した。
- 製造工程中で使用されている血液成分については参考として可能な限り記載したが、添加剤としてのアルブミンについては省略した。それらの成分については、表中の「分母」には含めていない。
- 推定 Rf 値は、プリオンのクリアランス指数 (Log) である。
- 推定 Rf 値は、文献調査、予備試験結果を含んでおり、また、様々なプリオン検出方法、添加試料を用いて得られたものであることから、統一された試験方法、評価基準がないため、相互に比較が困難である。同一分類内の各製剤毎の推定値の範囲を最大値と最小値を目安として表示することに留めるものであることに注意。
- 製品の Rf 値は各工程の合算値で表しているが、全工程を対象とした実際の Rf 値は必ずしも工程毎の Rf 値の合算値と一致しない場合がある。

文献

- 1 Cai K. et al. Biochimica et Biophysica Acta 2002; 1597: 28-35
- 2 Vey M. et al. Biologicals 2002; 30: 187-196
- 3 Lee D.C. et al. Transfusion, 2001; 41: 449-455
- 4 Lee D.C. et al. J. Virol Methods 2000; 84: 77-89
- 5 Tateushi J. et al. Biologicals 2001; 29: 17-25
- 6 Baron H. FDA TSE Advisory Committee Feb. 20, 2003
- 7 Stenland C.J. et al. Transfusion 2002; 42: 1497-1500
- 8 Flan B. et al. Cambridge Healthtech Institute's (CHI) TSE Conference Feb 12-13, 2003
- 9 Gregori L et al. Biologicals 2004; 32: 1-10
- 10 Brown P et al. Transfusion 1998; 38: 810-816
- 11 Foster PR Vox Sang 2000; 78: 86-95

プロセスバリデーションに適した PrP^{Sc} 分画の調製法に関する研究

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医科学研究科 プリオン病学講座教授

研究要旨

医薬品やその原料のプリオン汚染に関して、製造工程のプロセスバリデーションにより、定量的な安全性の評価が可能になる。現在、プリオンに関するプロセスバリデーションはプリオン感染動物の脳乳剤をスパイクして実施されているが、脳に蓄積した PrP^{Sc} は大きな凝集体を形成しているため、適切なプロセスバリデーションを実施するためには、スパイク材料として、脳乳剤そのものではなく粒子サイズの小さいプリオン分画を使用する必要があると考えられる。そこで、本研究では、プリオン感染マウスの脳から粒子サイズの小さい PrP^{Sc} を調製する方法について検討した。スクレイピー帯広株感染マウス脳から精製した PrP^{Sc} に DLPC (detergent-lipid-protein complex) 処理を行ったところ、20,000 × g の遠心上清に 50 %程度の PrP^{Sc} が残存したが、超遠心 (100,000 × g) ではすべて沈殿した。次に、プリオン感染マウス脳乳剤から種々の濃度の陰イオン界面活性剤 Sarkosyl (sodium *N*-lauryl sarcosinate) でプリオン蛋白質 (PrP) を抽出し、抽出される PrP^{Sc} の量と蛋白分解酵素抵抗性を調べた。その結果、0.5 % Sarkosyl で抽出した試料の 20,000 × g の遠心上清に全体の約 60 %の PrP^{Sc} が存在することが判明した。また、超遠心を使用した場合でも、0.5 % Sarkosyl 及び 1 % Sarkosyl で抽出した試料の 100,000 × g の遠心上清に約 30 %の PrP^{Sc} が存在した。この結果は、マウススクレイピー帯広株感染脳の 1 % Sarkosyl 抽出物中に超遠心で沈殿しない PrP^{Sc} が十分量存在することを意味しており、この画分がプロセスバリデーションのスパイク用 PrP^{Sc} として使用可能なことを示唆すると考えられる。

A. 研究目的

医薬品やその原料に混入しているかもしれない微量のプリオンが検出可能ならば、プリオンの汚染を直接評価できることになるが、現在までにそのような方法は確立されていない。しかし、製造工程でのプリオン除去率を求めるプロセスバリデーションにより、医薬品やその原材

料のプリオン汚染リスクを理論的に評価することが可能である。但し、プロセスバリデーションでは、スパイクするプリオンの性状により結果が異なることが予想される。脳に蓄積したプリオンは大きな PrP^{Sc} 凝集体を形成するため、脳乳剤を直接スパイクした場合、工程中で容易に沈殿したり物理的に排除されてしま

可能性が高いと考えられる。しかし、血液中に存在するプリオンは、脳由来のような大きな PrP^{Sc} 凝集体ではなく、小さな PrP^{Sc} オリゴマーを形成していると考えられる。プリオン 1 感染価を形成する最小の PrP^{Sc} オリゴマーのサイズはいまだ明らかになっていないが、超遠心後の上清にもプリオン感染性が残存することから、最小単位は決して大きくなく、医薬品などのプロセスバリデーションには、このような粒子サイズの小さい PrP^{Sc} オリゴマーを使用する必要があると考えられる。そこで、本研究では、PrP^{Sc} が多く含まれている脳から、高速遠心及び超遠心で沈殿しない、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} 画分を調製する方法について検討した。

B. 研究方法

スクレイピー帯広株感染マウスからの PrP^{Sc} の精製は Caughey らの方法 (1991) に従って行った。精製 PrP^{Sc} の detergent-lipid-protein complex (DLPC) 処理は以下のように実施した。すなわち、2 % Sarkosyl, 0.4 % phosphatidil choline, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に精製 PrP^{Sc} を懸濁し、Branson 社の Contamination-Free Ultrasonic Pre-processing System で 2 秒の超音波処理を 5 サイクル行った。

図 1 にスクレイピー感染マウス脳乳剤からの Sarkosyl 抽出のフローチャートを示した。10 % 脳乳剤に Sarkosyl を最終濃度 0.5 % になるように加え、超音波処理後、20,000 × g で 10 分又は 100,000 × g で 15 分遠心した。上清を回収して 2 等分し、一方を proteinase K (PK) (20 µg/mL) 処理した。PK 処理後、ブタノール-メタノール混合物によりプリオン蛋白質 (PrP) を回収した。遠心で得ら

れた沈殿に 1.0 % Sarkosyl を加え、超音波処理後、同様に遠心を行い、上清は PK 処理、沈殿は次の Sarkosyl 抽出を行った。Sarkosyl 抽出は 4 % まで 0.5 % ずつ Sarkosyl の濃度を上げて実施した。

PrP^{Sc} の検出はウエスタンブロット (WB) により行った。化学発光を LAS-3000 lumino-image analyzer で取り込み、定量解析を行った。

(倫理面への配慮)

プリオン感染マウスは北海道大学大学院獣医学研究科動物実験委員会にて承認された実験指針に従って行なった。感染性を含む試料の使用は北海道大学大学院獣医学研究科 BSL2 実験施設にて行なった。

C. 研究結果

精製 PrP^{Sc} の遠心による沈降を図 2 に示した。DLPC 未処理では 20,000 × g の遠心によりほぼすべての PrP^{Sc} が沈殿するが、DLPC 処理 (2 % Sarkosyl) により約 50 % の PrP^{Sc} が 20,000 × g の遠心上清に残存した。しかし、100,000 × g の遠心ではほとんどの PrP^{Sc} が沈殿した。

スクレイピー感染マウス脳乳剤から Sarkosyl で抽出した画分の 20,000 × g 遠心上清に含まれる総 PrP (PK 未処理) と PrP^{Sc} (PK 処理) を検出した結果を図 3 に示した。また、同様の実験を 3 回実施し、PrP 量を定量した結果を表 1 に示した。0.5 % Sarkosyl 抽出画分の 20,000 × g 遠心上清に、全体の約 70 % の PrP が存在し、0.5 及び 1.0 % Sarkosyl 抽出画分の両方を合わせると、全体の 90 % 以上が 20,000 × g の遠心上清に存在した。遠心上清の PrP は PK 処理後も検出されることから、大部分は PrP^{Sc} である。PrP^{Sc} 量で比較しても全体の約 90 % が 0.5 及び

1.0 % Sarkosyl 抽出画分の 20,000 × g 遠心上清に存在した。

遠心条件を 100,000 × g に変更した結果を図 4 に示した。超遠心を用いた場合は、4 % Sarkosyl 抽出画分でも沈殿する PrP が全体の 50 % を占めた。一方、0.5 及び 1.0 % 抽出画分の遠心上清には各々全体の 20 ~ 10 % 程度の PrP が残存した。上清中の PrP は PK 抵抗性であることから PrP^{sc} が含まれていることが確認できた。PrP^{sc} 量で比較しても、0.5 及び 1.0 % 抽出画分の遠心上清には各々全体の 15 % 程度の PrP^{sc} が存在することが判明した。

D. 考察

プロセスバリデーションのスパイク材料として精製度の高い PrP^{sc} を使用した方がよいと考え、脳から定法により精製した PrP^{sc} を DLPC 処理することにより粒子サイズの小さい PrP^{sc} を得ようと試みたが、100,000 × g の遠心ではすべて沈殿した。精製過程の分別遠心により強固な凝集体が形成されることが一因と考えられる。一方、脳乳剤から 0.5 ~ 1.0 % Sarkosyl で抽出される分画には、100,000 × g でも沈殿しないが、PK 抵抗性を示す PrP^{sc} が全体の約 30 % 存在した。このことは、この分画が適切なスパイク材料として使用可能であることを示唆している。本研究はマウススクレイピーを使用しているが、これまで BioReliance 社などで実施されたプロセスバリデーションの大部分ではハムスタースクレイピー 263K 株を使用していることから、今後ハムスター 263K 株を用いて同様の解析を行う必要がある。予備的な実験では、マウススクレイピー帯広株とは異なり、263K 株感染脳から Sarkosyl により抽出される PrP^{sc} は 2 % Sarkosyl

で最も多かった。したがって、使用するプリオンの株により、それぞれ最適な抽出条件を検討する必要がある。

E. 結論

マウススクレイピー帯広株感染脳の乳剤の 0.5 ~ 1 % Sarkosyl 抽出液中には、100,000 × g 遠心後も上清に留まる PrP^{sc} が約 30 % 存在した。この結果は 1 % Sarkosyl 抽出物中に超遠心で沈殿しない粒子サイズの小さい PrP^{sc} が十分量存在することを意味しており、プロセスバリデーションの際の適切なスパイク用 PrP^{sc} として、この画分が使用可能であることを示唆するものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

なお、感染性を有するプリオンを使用した実験は、BSL2 実験施設内で行ない、汚染物は 135 °C、30 分のオートクレーブ処理により不活化した。実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kim, C-L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Horiuchi, M. "Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies." *Virology* 320(1): 40-51 (2004)
- 2) Kim, C-L., Karino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, M., and Horiuchi, M. "Cell-surface retention of PrP^c by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." *J. Gen. Virol.* 85(11): 3473-3482 (2004)

- 3) Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M. "Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds." *J. Vet. Med. Sci.* 66(10): 1293-1295 (2004)

2. 学会発表

- 1) 金 チャンラン, 堀内 基広. "抗 PrP 抗体による培養細胞レベルでの PrP^{Sc} 産生抑制機構の解析." 第 52 回 日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2004, 横浜)
- 2) 山口 聡子, 宮澤 孝幸, 堀内 基広. "人工合成硫酸化糖アナログによる PrP^{Sc} 産生抑制." 第 52 回日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2004, 横浜)
- 3) Horiuchi, M. "Inhibition of protease-resistant prion protein (PrP) formation by anti-PrP antibodies." The 7th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, The 6th COE International Symposium for Zoonosis Control (8 Jul. 2004, Sapporo, Japan)
- 4) Horiuchi, M., Tamura, Y., and Furuoka, H. "Comparative analyses of

three mouse-adapted scrapie strains G1, Obihiro, and I3/I5 and pathogenesis of G1 strain-induced polyuria in ICR mice." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31 Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)

- 5) Horiuchi, M., Kim, C.-L., Ogino, M., Furuoka, H., and Shinagawa, M. "Cell surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31 Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)
- 6) Horiuchi, M. "BSE screening in Japan." The animal prion disease and USE (14-16 Oct. 2004, Ames, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

本年度は該当なし。

2. 実用新案登録

本年度は該当なし。

3. その他

本年度は該当なし。

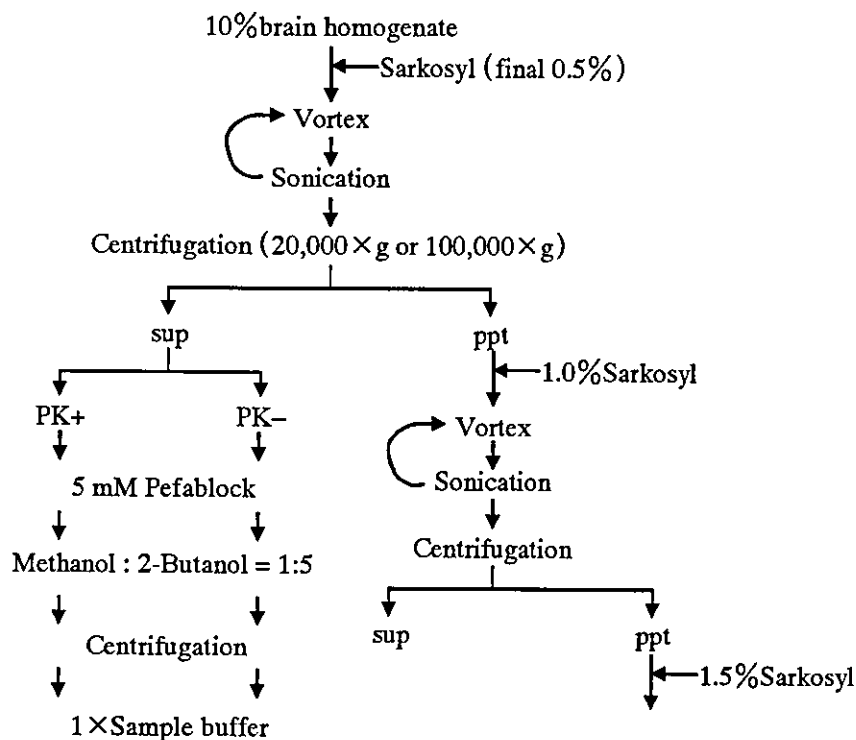


図1 スクレイパー感染マウス脳乳剤からのPrP^{Sc}の抽出

10%脳乳剤にSarkosylを最終濃度0.5%になるように加え、ボルテックス、超音波処理を3サイクル行った後に、20,000×gあるいは100,000×gで遠心した。上清は2等分し、一方はPK処理、他方はPK未処理対照として、SDS-PAGE用のサンプルを作製した。沈殿に1.0% Sarkosyl in PBSを加え、ボルテックス、超音波処理を3サイクル行った後に、20,000×gあるいは100,000×gで遠心した。以下、同様の処理を4.0% Sarkosylまで実施した。

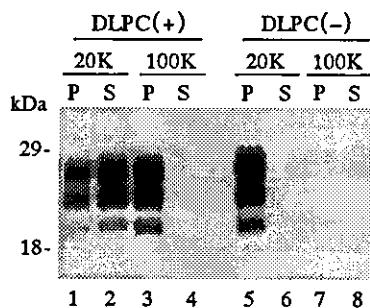


図2 精製PrP^{Sc}のDLPC処理による粒子サイズの変化

精製PrP^{Sc}をDLPC処理せずに遠心した場合 [DLPC(-)]は、20,000×g (20K) の遠心上清には検出されなかった (レーン5-8)。DLPC処理後[DLPC(+)]は、20,000×g (20K) の遠心上清に約55%のPrP^{Sc}が残存したが (レーン1, 2)、100,000×gの遠心では沈殿した (レーン3, 4)。

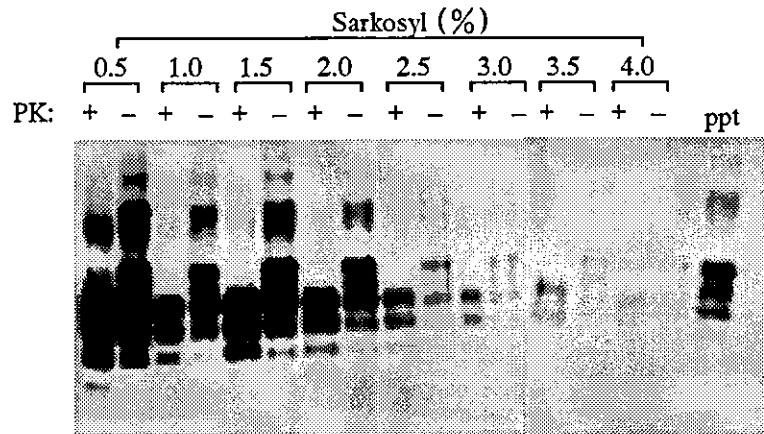


図3 Sarkosyl抽出画分中の20,000×g遠心上清に含まれるPrP^{Sc}のPK抵抗性
 各々の濃度のSarkosyl抽出画分の20,000×g遠心上清中に存在する総PrP (PK-) とPrP^{Sc} (PK+) を示した。総PrP (あるいはPrP^{Sc}) に対する各抽出画分中のPrP (あるいはPrP^{Sc}) 相対量の平均値とSD (n=3) は表1に示した。1.5~3.0%の組織当量を1とすると、0.5及び1.0%は1/5組織当量、3.5及び4.0%は2組織当量の試料を電気泳動した。

表1 20,000g × g の遠心による Sarkosyl 抽出 PrP^{Sc} の沈殿

Sarkosyl (%)	PK(+)PrP/total PK(+)PrP	PK(-)PrP/total PK(-)PrP
0.5	0.62 ± 0.05	0.74 ± 0.11
1.0	0.26 ± 0.04	0.20 ± 0.08
1.5	0.08 ± 0.05	0.04 ± 0.01
2.0	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
2.5	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
3.5	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4.0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

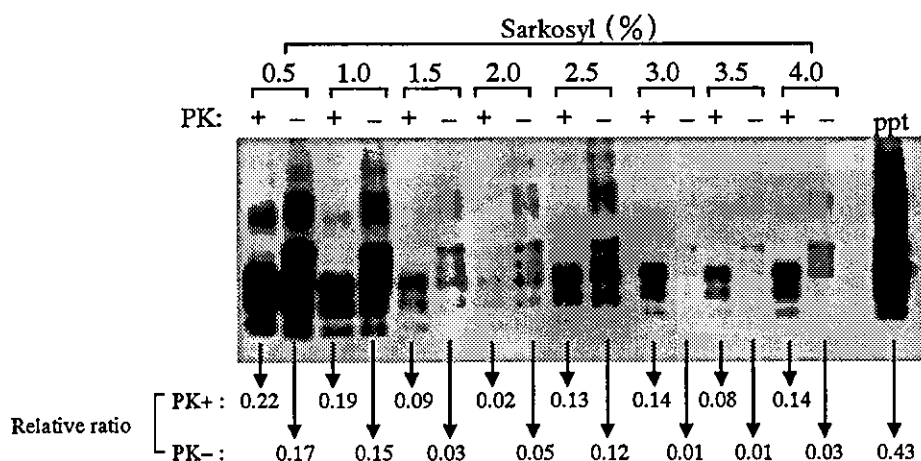


図4 Sarkosyl抽出画分中の100,000×g遠心上清に含まれるPrP^{Sc}のPK抵抗性
 各々の濃度のSarkosyl抽出画分の100,000×g遠心上清中に存在する総PrP (PK-) とPrP^{Sc} (PK+) を示した。総PrP (あるいはPrP^{Sc}) に対する各抽出画分中のPrP (あるいはPrP^{Sc}) 相対量を図下に示した。

異常プリオンの処理方法の能力評価に関する試験研究

分担研究者 菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 主任研究官

研究要旨

遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、その原材料に混入するおそれがある異常プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の検出法及び製造工程での除去技術の開発が望まれている。

製造原材料の品質確保及び種々の製造工程の安全性評価を目的とし、PrP^{Sc} の検出法の開発に資する基礎研究として、蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質（PrP^{Res}）を産生する、継代を重ねた後に長期間培養したヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G が発現する mRNA の解析を行った。T98G 細胞は、プリオン蛋白質（PrP）の C 末端と GPI アンカーシグナル配列を欠損したスプライス変異型 PrP の mRNA を発現していた。そのオープンリーディングフレーム（ORF）の塩基配列から推定される 1 次構造は、PrP と共通の 1 ～ 217 残基に新たな 13 残基を付加した 230 残基のアミノ酸からなり、PrP と 94 % の相同性を有していた。

さらに、スプライス部位を横断したエクソン結合部位に特異的な配列を有するプライマー（exon-exon junction primer）を設計し、スプライス変異型 PrP の mRNA を検出する RT-PCR を確立した。本法を用いることにより、ヒト脳を含む市販の各種臓器由来 total RNA 中にスプライス変異型 PrP の mRNA を検出した。

以上の成果から、生体由来の医薬品原料に対する添加回収実験等の試料として PrP のみならずスプライス変異型 PrP も用いた場合の検出系を確立すること及びスプライス変異型 PrP の機能解明を目的として、PrP の C 末端及びスプライス変異型 PrP の C 末端をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を作製した。

今回新たに見出したヒトのスプライス変異型 PrP や新たに作製した抗スプライス変異型 PrP モノクローナル抗体等は、医薬品製造工程等における異常プリオン蛋白質の除去技術の評価への利用が期待できる。

A. 研究目的

ヒトのプリオン病には硬膜移植等によって発症した感染性 CJD、プリオン蛋白質遺伝子（PRNP）にコードされた 253 残基のアミノ酸に変異がある遺伝型 CJD

及び PRNP に変異のない散発型 CJD が知られ、約 85 ～ 90 % を散発性 CJD が占めている。また、1996 年に英国で発症が確認された変異型 CJD は、従来の CJD とは異なり、患者の異常プリオン蛋

白質 (PrP^{Sc}) の生化学的研究及び英国で多発していたウシ海綿状脳症 (BSE) に関する疫学研究から、ウシ PrP^{Sc} のヒトへの伝達によって発症すると考えられている。

一方、細胞培養で産生される遺伝子組換え医薬品等には製造工程に血清等のウシ由来原料が用いられているものが多く、それらの安全性を確保するため、原材料に混入するおそれがある PrP^{Sc} の検出法及び製造工程での除去技術の開発が望まれている。PrP^{Sc} は正常プリオン蛋白質 (PrP^C) と同一のアミノ酸配列を有し、蛋白質分解酵素処理や熱に耐性を示すことから、いまだに原材料等への混入を高感度に検出する技術及び製造工程から有効に除去する技術は確立されていない。

本研究では、製造原材料の品質確保及び種々の製造工程の安全性評価を目的とし、PrP^{Sc} の検出法の開発に資する基礎研究として、蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質 (PrP^{Res}) を産生する、継代を重ねた後に長期間培養したヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G が発現する mRNA の解析を行った。また、ここで得られた mRNA 塩基配列から推定される特異的なプリオン蛋白質 (PrP) を認識するモノクローナル抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

1. 細胞培養

ヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G は T75 組織培養用フラスコで培養し、1 週間に 1 度の継代を行った。長期間の培養は 9 cm 組織培養用シャーレで行い、4 日ごとに培地を交換した。

2. RT-PCR

T98G 細胞を培養後、DNase 消化した total RNA を調製し、スーパースク립ト II RNase H 逆転写酵素 (インビトロジェン株式会社) を用いてファーストストランド cDNA を合成した。脳を含む各種ヒト臓器由来 total RNA は日本ベクトン・ディッキンソン株式会社から購入し、同様にファーストストランド cDNA を合成した。PCR は PRNP (GenBank accession No. AL133396) の exon 2 にコードされている PrP オープンリーディングフレーム (ORF) の mRNA を検出する各種プライマーと、KOD plus polymerase (東洋紡績株式会社) 又は Ex taq polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いて行った。

3. 抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

ヒト PrP のアミノ酸配列 218 ~ 230 残基の C 末端に Cys を付加したペプチドに *m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミド (MBS) を架橋剤としてウシ血清アルブミン (BSA) に結合させた免疫原 hPrP(218-230)-Cys-BCIP を調製し、BALB/c マウスを免疫した後、その脾細胞とマウスミエローマ細胞 PCI とで細胞融合を行い、固相抗原として hPrP(218-230)-Cys-BCIP 又は組換えウシプリオン蛋白質 (rBoPrP) を用いた ELISA で培養上清をスクリーニングした。また、スプライス変異型 PrP の予想されるアミノ酸配列 214 ~ 230 残基に相当するペプチドに MBS を架橋剤として BSA に結合させた免疫原 hPrPSV(214-230)-BSA を調製し、BALB/c マウスを免疫した後、その脾

細胞とマウスミエローマ細胞 NS-1 とで細胞融合を行い、固相抗原として hPrPSV(214-230)-OVA 又は hPrP(214-230)-OVA を用いた ELISA で培養上清をスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、3 省ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定、同病原体等安全管理規程及び同動物実験に関する指針を遵守した。

C. 研究結果

1. スプライス変異型プリオン蛋白質 mRNA の発現

PRNP がコードする mRNA の発現様式を調べるため、各種条件下で培養した T98G 細胞から調製した total RNA を鋳型とし、KOD plus polymerase を用いて RT-PCR を行った。

13 回の継代後に 24 日間培養した T98G 細胞 (P13D24) から調製した total RNA では、*PRNP* exon 2 の 434 ~ 961 に相当する 528 塩基対 (bp) のバンドを検出した (Fig. 1a, lane 1)。一方、さらに 40 日まで培養した T98G 細胞 (P13D40) から調製した total RNA では、先のものより短い 296 bp のバンドを示した (Fig. 1a, lane 3)。296 bp のバンドをゲルから切り出してその塩基配列を解析したところ、PrP の C 末端と GPI アンカーシグナル配列を含む 232 bp が 528 bp の内部から欠落していた (Fig. 1, lower panel)。同時に調製した T98G 細胞 (P13D40) の genomic DNA を鋳型とした PCR では 528 bp のバンドを示し、296 bp と同じ塩基配列は存在しなかった (Fig. 1b、

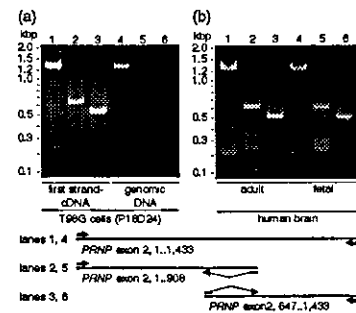


Fig. 1 Expression of splice variant of PrP mRNA in T98G cells.

(a) T98G cells were incubated after repeated passages. First strand-cDNA from total RNA (5 µg) were prepared from T98G cells for 24 days after 13 passages (P13D24, lanes 1-2), for 40 days after 13 passages (P13D40, lanes 3-6). (b) T98G cells for 24 days after 18 passages (P18D24) were exposed to hypoxia (5 % O₂, lanes 1-2) or normoxia (lanes 3-6) for the last 1 day. First strand-cDNA from total RNA (5 µg) and genomic DNA (2.5 ng) were prepared, followed by PCR using human PrP primer set (odd lanes) and β-actin primer set (even lanes) with KOD Plus polymerase.

lane 5)。以上の結果から、継代数を重ねた後に長期間培養した T98G 細胞では、*PRNP* exon 2 のスプライス変異型 RNA を発現することが示唆された。

次に、低酸素濃度下で培養した T98G 細胞が発現する mRNA の解析を行った。18 回の継代後に通常の酸素濃度下 (normoxia) で 24 日間培養した T98G 細胞 (P18D24) から調製した total RNA では、*PRNP* exon 2 の 434 ~ 961 に相当する 528 bp のバンドを検出した (Fig. 1b, lane 3)。一方、通常の酸素濃度下で 23 日間培養後、低酸素濃度下 (5 % O₂ ; hypoxia) で 1 日間培養した T98G 細胞から調製した total RNA では、P13D40 と同様に 296 bp のバンドを示した (Fig. 1b, lane 1 ; Fig. 1, lower panel)。同時に調製した T98G 細胞 (P18D24) の genomic DNA を鋳型とした PCR では 528 bp のバンドを示

し、296 bp と同じ塩基配列は存在しなかった (Fig. 1b、lane 5)。

2. エクソン結合部位に特異的なプライマー (exon-exon junction primer) を用いたスプライス変異型プリオン蛋白質 mRNA の検出

スプライス変異型 PrP の mRNA を検出することを目的とし、エクソン結合部位に特異的に結合するプライマー (exon-exon junction primer) を設計し、Ex taq polymerase を用いて RT-PCR を行った。

PrP の ORF を含む *PRNP* exon 2 の 1 ~ 1,433 に結合するプライマーを用いた PCR では、T98G 細胞 (P18D24) から調製したファーストストランド DNA 及び genomic DNA 中に 1,433 bp のバンドを示し (Fig. 2a、lanes 1 and 4)、ゲルから切り出した 1,433 bp のバンドの塩基配列は *PRNP* exon 2 と一致した。一方、スプライシングで欠落する部位 (232 bp) を挟み、その両端の配列を結合させたプライマーを用いた PCR では、ファーストストランド DNA で 676 及び 555 bp のバンドを示したが (Fig. 2a、lanes 2-3)、genomic DNA ではバンドが検出されなかった (Fig. 2a、lanes 5-6)。また、ゲルから切り出した 676 及び 555 bp のバンドの塩基配列は、*PRNP* exon 2 のそれぞれ 908 及び 787 bp に相当する部位から 232 bp の配列が欠落したものと一致した。以上の結果から、設計した exon-exon junction primer はエクソン結合部位と結合し、これによりスプライス変異型 PrP の mRNA が特異的に検出できることが示された。

次に、市販のヒト由来 total RNA から調製したファーストストランド

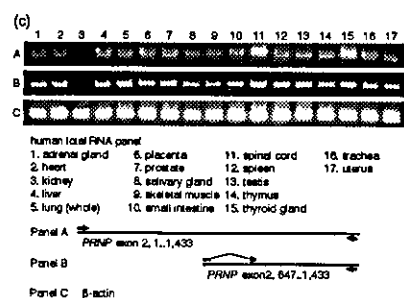


Fig. 2 Detection of splice variant of PrP mRNA using exon-exon junction primers.

(a) T98G cells were incubated for 24 days after 18 passages (P18D24). First strand-cDNA from total RNA (5 μ g) and genomic DNA (2.5 ng) were prepared, followed by PCR using *PRNP* exon 2 primer set (1-22 and 1,433-1,411; lanes 1 and 4) and 24-nucleotide exon-exon junction primers (lanes 2-3 and 5-6) with Ex taq polymerase. (b) First strand-cDNA from adult human brain total RNA and human fetal brain total RNA (5 μ g each; BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) were prepared, followed by PCR using the *PRNP* exon 2 primer set (lanes 1 and 4) and the exon-exon junction primers (lanes 2-3 and 5-6) with Ex taq polymerase. (c) First strand-cDNA from adult human total RNA panel (5 μ g each; BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) were prepared, followed by PCR using the *PRNP* exon 2 primer set (Panel A), the exon-exon junction primers (Panel B), and β -actin (Panel C) with Ex taq polymerase.

DNA を鋳型とし、exon-exon-junction primer を用いた RT-PCR を行った。成人及び胎児の脳から調製したファーストストランド DNA では 1,433 bp のバンド (Fig. 2b、lanes 1 and 4) 並びに 232 bp が欠落した 676 及び 555 bp のバンド (Fig. 2b、lanes 2-3 and 5-6) が検出された。同様に、成人各種臓器から調製したファーストストランド DNA で 1,433 bp のバンド (Fig. 2c、Panel A) と 555 bp のバンド (Fig. 2c、Panel C) が検出され、T98G 細胞と同様にスプライス変異型 PrP mRNA の存在が示唆された。

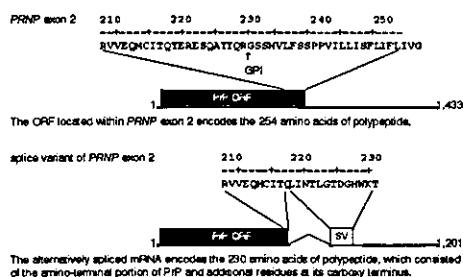


Fig. 3 Schematic representation of alternative splicing model of PRNP exon 2 (1-1,433).

3. 抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

先に確認したスプライス変異型 PrP の ORF は 230 アミノ酸をコードし、1 ~ 217 残基までは PrP と同じ 1 次構造を有している (Fig. 3)。PrP 及びスプライス変異型 PrP の蛋白質発現を確認するため、それぞれの C 末端に相当するペプチドに対するマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立を行った。ヒト PrP の 218 ~ 230 残基に相当するペプチド (hPrP(218-230)) でマウスを免疫し、その脾細胞からハイブリドーマ 3 株を樹立した。産生する IgM クラスの抗体は、ELISA で固相抗原のペプチド hPrP(218-230) 及び遺伝子組換えウシ PrP (rBoPrP) を認識した (Fig. 4a)。同様に、スプライス変異型 PrP の ORF から予想される 214 ~ 230 残基に相当するペプチド (hPrPSV(214-230)) でマウスを免疫し、その脾細胞からハイブリドーマ 7 株を樹立した。産生する IgG クラスの抗体は、ELISA でスプライス変異型 PrP のペプチド hPrPSV(214-230) を認識したが、通常のペプチド (214 ~ 230 残基; hPrP(214-230)) は認識しなかった (Fig. 4b)。

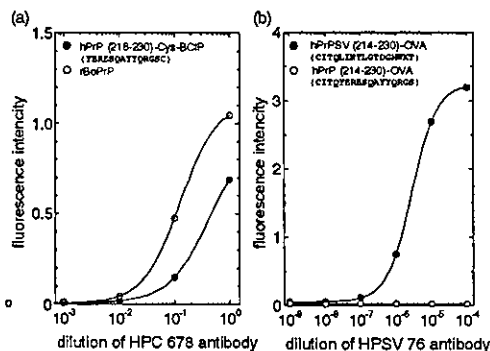


Fig. 4 Binding of antibodies to coating antigen in ELISA.

(a) Various concentration of anti-hPrP (218-230) antibody (HPC 678) were incubated with hPrP (218-230)-Cys-BCIP (●) or rBoPrP (○) as coating antigen. (b) Various concentration of anti-hPrPSV(214-230) antibody (HPSV 76) were incubated with hPrPSV(214-230)-OVA (●) or hPrP (214-230)-OVA (○) as coating antigen.

D. 考察

ヒトグリオーマ細胞株 T98G は PrP^C を産生し (Kikuchi, Y., *et. al.* Biol. Pharm. Bull. 25: 728-733 (2002))、継代を重ねた後に長期間培養すると PK 処理抵抗性の PrP^{Sc} を産生する (Kikuchi, Y., *et. al.* J. Gen. Virol. 85: 3449-3457 (2004))。この条件下で T98G 細胞は、PrP の C 末端部位と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型の mRNA を発現していた。その ORF は 230 アミノ酸をコードし、1 ~ 217 残基までは PrP と同じ 1 次構造で、94 % の相同性を有している (Fig. 3)。スプライス変異型 mRNA の発現は、T98G 細胞だけではなく、市販の各種ヒト臓器由来 total RNA で確認された。

生体由来の医薬品原料に対する添加回収実験等の試料としてヒト PrP のみならずスプライス変異型 PrP も用いた場合の検出系を確立すること及びスプライス変異型 PrP の機能解明を目的として、PrP の C 末端及びスプライス変異型 PrP の C 末端をそれぞれ認識するモノクローナル

抗体を作製した。このうち、ヒト PrP の C 末端 218 ~ 230 残基を認識する抗体は、ELISA で遺伝子組換えウシ PrP も固相抗原として認識した。これらのスプライス変異型 PrP や遺伝子組換えウシ PrP などの蛋白質、及び各蛋白質に対する抗体は、医薬品製造工程等における異常プリオン蛋白質の除去技術の評価への利用が期待できる。

本研究で確認したスプライス変異部位は PRNP exon 2 下流の 3' UTR に存在する。この部位に相当するウシ及びマウス exon 3 の 3' UTR の塩基配列はよく保存されており、これらの動物種でもスプライス変異型 PrP の mRNA を発現している可能性がある。異常プリオン蛋白質の産生へのスプライス変異型 PrP mRNA 発現の関与は今のところ不明であるが、次年度以後は、様々な遺伝子組換え医薬品等の製造に用いられる細胞培養株におけるスプライス変異型 PrP mRNA の発現の有無を、exon-exon junction primer を用いた RT-PCR により確認する予定である。

E. 結論

本年度は、継代を重ねた後に長期間培養した T98G 細胞において、PrP の C 末端と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプライス変異型 PrP mRNA が発現していることを確認した。この mRNA は 230 残基のアミノ酸をコードする ORF を含み、その 1 ~ 217 残基は PrP と共通であった。さらに、エクソン結合部位に特異的な exon-exon junction primer を設計してスプライス変異型 PrP mRNA を検出する RT-PCR を構築し、市販の各種ヒト臓器由来 total RNA 中にスプライス変異型 PrP mRNA が存在することを確認した。以上の成果を踏まえて、PrP と 1 次構造が異なると予想される C 末端部位

を認識する抗スプライス変異型 PrP モノクローナル抗体を作製した。

今回新たに見出したヒトのスプライス変異型 PrP や新たに作製した抗スプライス変異型 PrP モノクローナル抗体等は、医薬品製造工程等における異常プリオン蛋白質の除去技術の評価への利用が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi, Y., Takeya, T., Sakai, A., Takatori, K., Nakamura, N., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., and Sawada, J. "Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G." J. Gen. Virol. 85: 3449-3457 (2004)

2. 学会発表

- 1) 菊池 裕, 掛谷 知志, 酒井 綾子, 松田 治男, 山崎 壮, 棚元 憲一, 池田 喜久子, 山口直人, 澤田純一, 高鳥浩介. "低酸素濃度下で培養したヒトグリオブラストーマ T98G 細胞株のスプライシング変異プリオン蛋白質遺伝子の発現." 第 77 回日本生化学会大会 (13-16 Oct. 2004, 横浜)
- 2) Kikuchi, Y., Takeya, T., Sakai, A., Matsuda, H., Yamazaki, T., Tanamoto, K., Ikeda, K., Yamaguchi, N., Sawada, J., and Takatori, K. "Expression of a splice variant of prion protein during hypoxia in human glioblastoma cell line T98G." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31

Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

本年度は該当なし。

2. 実用新案登録

本年度は該当なし。

3. その他

本年度は該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版年	ページ

著者氏名	論文タイトル名	書籍名	巻号	ページ	出版年
Chan-Lan Kim, Atsushi Umetani, Toshio Matsui, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa, and Motohiro Horiuchi	Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies	Virology	320(1)	40-51	2004
Altagerel Gombojav, Naotaka Ishiguro, Motohiro Horiuchi, and Morikazu Shinagawa	Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds	Journal of Veterinary Medical Science	66(10)	1293-1295	2004
Yutaka Kikuchi, Tomoshi Takeya, Ayako Sakai, Kosuke Takatori, Naoto Nakamura, Haruo Matsuda, Takeshi Yamazaki, Ken-ichi Tanamoto, and Jun-ichi Sawada	Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G	Journal of General Virology	85(11)	3449-3457	2004
Chan-Lan Kim, Ayako Karino, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa, Motoyoshi Sato, and Motohiro Horiuchi	Cell-surface retention of PrP ^{Sc} by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation	Journal of General Virology	85(11)	3473-3482	2004

研究成果の刊行物・別刷

- 1) Chan-Lan Kim, Atsushi Umetani, Toshio Matsui, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa, and Motohiro Horiuchi. "Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies." *Virology* 320(1): 40-51 (2004).
- 2) Altagerel Gombojav, Naotaka Ishiguro, Motohiro Horiuchi, and Morikazu Shinagawa. "Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds." *Journal of Veterinary Medical Science* 66(10): 1293-1295 (2004).
- 3) Yutaka Kikuchi, Tomoshi Takeya, Ayako Sakai, Kosuke Takatori, Naoto Nakamura, Haruo Matsuda, Takeshi Yamazaki, Ken-ichi Tanamoto, and Jun-ichi Sawada. "Propagation of a protease-resistant form of prion protein in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G." *Journal of General Virology* 85(11): 3449-3457 (2004)
- 4) Chan-Lan Kim, Ayako Karino, Naotaka Ishiguro, Morikazu Shinagawa, Motoyoshi Sato, and Motohiro Horiuchi. "Cell-surface retention of PrP^C by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." *Journal of General Virology* 85(11): 3473-3482 (2004)

Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies

Chan-Lan Kim,^a Atsushi Umetani,^b Toshio Matsui,^b Naotaka Ishiguro,^a Morikazu Shinagawa,^{a,1} and Motohiro Horiuchi^{a,c,*}

^aLaboratory of Veterinary Public Health, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

^bObihiro Research Laboratory, Fujirebio Inc., Kawanishi-cho, Obihiro, Hokkaido 089-1111, Japan

^cResearch Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

Received 14 July 2003; returned to author for revision 22 October 2003; accepted 22 October 2003

Abstract

We established a panel of monoclonal antibodies (mAbs) against prion protein (PrP) by immunizing PrP gene-ablated mice with the pathogenic isoform of prion protein (PrP^{Sc}) or recombinant prion protein (rPrP). The mAbs could be divided into at least 10 groups by fine epitope analyses using mutant rPrPs and pepspot analysis. Seven linear epitopes, lying within residues 56–90, 119–127, 137–143, 143–149, 147–151, 163–169, and 219–229, were defined by seven groups of mAbs, although the remaining three groups of mAbs recognized discontinuous epitopes. We attempted to examine whether any of these epitopes are located on the accessible surface of PrP^{Sc}. However, no mAbs reacted with protease-treated PrP^{Sc} purified from scrapie-affected mice, even when PrP^{Sc} was dispersed into a detergent–lipid protein complex, to reduce the size of PrP^{Sc} aggregates. In contrast, denaturation of PrP^{Sc} by guanidine hydrochloride efficiently exposed all of the epitopes. This suggests that any epitope recognized by this panel of mAbs is buried within the PrP^{Sc} aggregates. Alternatively, if the corresponding region(s) are on the surface of PrP^{Sc}, the region(s) may be folded into conformations to which the mAbs cannot bind. The reactivity of a panel of mAb also showed that the state of PrP^{Sc} aggregation influenced the denaturation process, and the sensitivity to denaturation appeared to vary between epitopes. Our results demonstrate that this new panel of well-characterized mAbs will be valuable for studying the biochemistry and biophysics of PrP molecules as well as for the immunodiagnosis of prion diseases.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Scrapie; Prion; BSE; Monoclonal antibody; Epitope mapping

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), so-called prion diseases, are fatal neurodegenerative diseases including scrapie in sheep and goats, bovine spongiform encephalopathy, and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) in humans (Prusiner, 1991). The causative agent, prion, is thought to be composed solely, if not entirely, of a pathogenic isoform of the prion protein (PrP^{Sc}). PrP^{Sc} is generated from a host-encoded cellular prion protein (PrP^C)

by certain post-translational modifications including a conformational transformation. Although the two PrP isoforms share the same primary structure (Hope et al., 1986), PrP^{Sc} is distinguished from PrP^C by biochemical and biophysical properties such as high β -sheet content (Pan et al., 1993; Safar et al., 1993), partial resistance to protease digestion, and insolubility in nonionic detergent (Meyer et al., 1986). The conformational transformation from PrP^C to PrP^{Sc} requires preexisting PrP^{Sc} as a template and is thought to be a central event in PrP^{Sc} formation and prion replication. However, the molecular mechanism of the conformational transformation remains unclear. To elucidate the mechanism, structural information from two PrP isoforms is needed. At this time, the NMR structure of a recombinant PrP resembling PrP^C has been determined (Riek et al., 1996), whereas the structure of PrP^{Sc} is not yet known.

* Corresponding author. Laboratory of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita, Sapporo 060-0818, Japan. Fax: +81-11-706-5293.

E-mail address: horiuchi@vetmed.hokudai.ac.jp (M. Horiuchi).

¹ Present address: Prion Disease Research Center, National Institute of Animal Health, Kannondai, Tsukuba, Ibaragi, 305–0856, Japan.

A diverse panel of anti-PrP mAbs is invaluable for analyzing the difference between PrP^C and PrP^{Sc}, as well as for the biochemical and structural analysis of PrP molecules. To date, many monoclonal antibodies (mAbs) against PrP have been generated by immunizing with PrP^{Sc} purified from scrapie-affected animals (Barry and Prusiner, 1986; Kascsak et al., 1987; Williamson et al., 1996), recombinant PrP (Zanusso et al., 1998), synthetic PrP peptides (Harmeyer et al., 1998; Horiuchi et al., 1995; O'Rourke et al., 1998), or a PrP expression plasmid (Krasemann et al., 1996). Most of the anti-PrP antibodies developed so far react with linear or discontinuous epitopes on PrP^C and recombinant PrP molecules, as well as with PrP^{Sc} treated with denaturant. These types of anti-PrP antibodies are now widely used for the immuno-detection of PrP^{Sc}. Because these antibodies themselves cannot distinguish the two PrP isoforms when the molecules are treated with denaturant, proteolytic removal of PrP^C before immuno-staining is essential for the detection of PrP^{Sc} by immunoblotting or enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). One mAb, designated 15B3, generated by immunizing PrP gene-deficient mice with recombinant bovine PrP, was reported to recognize a PrP^{Sc}-specific conformational epitope consisting of two PrP molecules (Korth et al., 1997). However, further characterization of this mAb has not been published. Recent reports also describe mAbs that appear to recognize discontinuous epitopes on PrP^C but do not appear to react with PrP^{Sc} (Yokoyama et al., 2001).

Further PrP^{Sc}- and PrP^C-specific antibodies, as well as additional characterized antibodies to PrP molecules, will

help to elucidate the structure–function relationships of PrP, structural differences between PrP^C and PrP^{Sc}, and mechanisms of conformational transformation. In addition, new antibodies showing higher reactivity and specificity than those currently available would help to improve the sensitivity of PrP^{Sc} detection. Although a large number of antibodies against PrP have been generated, it is possible that undefined epitopes still exist. In this study, we established a panel of mAbs that covers diverse epitopes on the mouse PrP molecules by immunizing PrP^{-/-} mice with either recombinant mouse PrP or PrP^{Sc} purified from scrapie-affected mouse brains. The mAbs could be at least divided into 10 groups based on fine epitope mapping. Finally, we discuss how this panel of well-characterized mAbs will be useful for analyzing the molecular properties of PrP as well as for diagnostic purposes.

Results

Production of monoclonal antibodies against PrP molecules

For the immunization of PrP gene-ablated mice, we prepared rMoPrP as well as PrP^{Sc} from brains of scrapie-affected mice. Fig. 1 shows the purity of rMoPrP and PrP^{Sc}. rMoPrP23–231 expressed by pRSETB in *E. coli* formed inclusion bodies (Fig. 1A). The rMoPrP23–231 recovered from inclusion bodies was dissolved with 6 M GdnHCl, and further purified with Ni²⁺-charged IMAC. After dialysis, rMoPrP possessing an intramolecular disulfide bond was

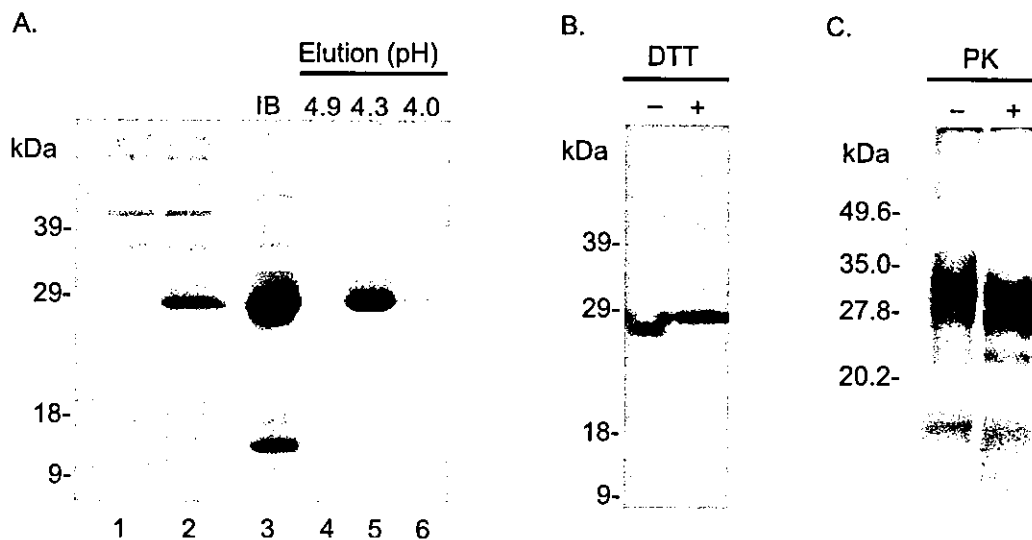


Fig. 1. Purity of rPrP and PrP^{Sc}. (A) Purification of rPrP from bacterial lysates. Whole lysates of *E. coli* transformed with pRSETB (lane 1) and pRSETB/MoPrP23–231 (lane 2) after induction with IPTG for 2 h. Inclusion bodies were prepared from whole bacterial lysates (lane 3) for partial purification of rPrP. Inclusion bodies were dissolved in 6 M GdnHCl and applied to Ni²⁺-charged IMAC. The rPrP was eluted with a stepwise pH gradient (lanes 4–6), and rPrP eluted at pH 4.3 was dialyzed against acetate buffer to remove GdnHCl. (B) Formation of intramolecular disulfide bonds. After the dialysis, rPrP possessing an intramolecular disulfide bond was collected by reverse-phase HPLC. DTT + and – indicates purified rPrP dissolved with sample buffer with and without 100 mM DTT. (A and B) Coomassie blue staining. (C) Purity of PrP^{Sc} fraction from scrapie-affected mouse brains. The PrP^{Sc} fraction treated (+) and untreated (–) with PK was visualized by silver staining and the purity was estimated by densitometric analysis by using Atto Densitograph (Atto Co. Ltd.). Molecular mass markers are in kilodaltons (kDa).

collected by reverse-phase HPLC (Fig. 1B). The MoPrP^{Sc} prepared from brains of scrapie-affected mice was estimated to be >70% pure even without PK treatment (Fig. 1C), and a bioassay revealed that this fraction was estimated to contain more than 10^{11} LD₅₀/mg from our dose–incubation time standard curve for Obihiro strain (data not shown). These PrP fractions were used for immunization of PrP gene-ablated mice, and splenocytes from immunized mice were fused with myeloma cells. Hybridomas positive for both rMoPrP and MoPrP^{Sc}, or those positive either for rMoPrP or MoPrP^{Sc}, were selected. Finally, we established 4, 10, and 15 hybridomas using rMoPrP23–231, rMoPrP89–231 or MoPrP^{Sc}, respectively, as the immunogen (Table 1).

Epitope analyses

To determine the epitopes recognized by the mAbs, we first examined their reactivity to various mutant rPrPs by ELISA. Based on their reactivity, the mAbs were divided into seven groups (Table 1). The mAbs in group I did not react with rMoPrP lacking the N-terminal region, indicating that their epitopes are located in residues 23–89. Group II mAbs reacted with all rMoPrPs except for rMoPrP155–231, indicating that they recognize the regions between residues 89 and 155. Group III consists of mAb 43C5, which reacted with all rMoPrPs, suggesting that its epitope is located between residues 155 and 167. The mAbs in group IV did not react with mutants lacking the C-terminus but reacted with other mutants, indicating that they recognize the epitopes on the C-terminal part of PrP molecule. The mAbs in group V reacted with rMoPrP155–231 but not with rMoPrP23–214. In addition, these mAbs did not react with point mutants rHaPrPC179A and rHaPrPC214A in which the cysteines at residues 179 and 214, respectively, were replaced with alanine. The mAbs reacted equally with

rMoPrP23–231 and rHaPrP23–231 (data not shown), indicating amino acid differences between Mo and HaPrP did not influence the reactivity. These facts suggest that mAbs in groups V recognize discontinuous epitopes, including the region within residues 155–231, and that the epitopes are dependent on the intramolecular disulfide bond in the PrP molecule. The mAbs in group VI reacted with rMoPrP89–231, but neither reacted with rMoPrP155–231 nor point mutants of rHaPrP, suggesting that the epitope for these mAbs include the region within residues 89–231 and also are dependent on the intramolecular disulfide bond. The reactivity of mAb 72 (group VII) was difficult to figure out the epitope. It reacted with rMoPrP89–231 and 23–167, suggesting that the epitope is located within residues 89–167. However, the mAb did not react with rMoPrP23–214, rHaPrPC179A, or rHaPrPC214A, but reacted with rHaPrP23–231, again suggesting that the epitope depends on the presence of the intramolecular disulfide bond.

Further precise epitope mapping was carried out by pepspots analysis (Fig. 2). The reactivity of the group I mAbs revealed that they recognize a portion of octa-peptide repeat in N-terminus, although there is some difference in the amino acid sequence recognized by these mAbs. Based on the reactivity (Fig. 2A), the epitope for mAb 8 was WGQPHG at aa 56–61, 64–69, 72–77, and 80–85. mAbs 110 and 37 reacted with peptides 16–19 and 28–31, indicating that the recognized sequence is PHGGGWG at aa 59–65 and 83–89 (Fig. 2B). mAbs 40, 106, and 162 showed broad reactivity to peptides ranging from 13 to 33 (Fig. 2C). The reaction to peptides including 17 to 19 and 29 to 33 the most intense, suggesting that the major recognition sequence for these mAbs is PHGGGWGQ at aa 59–66 and 83–90, although the minimum required sequence appears to be WGQ. The group II mAb 132 reacted with peptides from 47 to 49, which share residues

Table 1
Grouping of mAbs based on the reactivity to rPrP deletion and point mutants

Group	mAb ^a (Isotype ^b)	rPrP used as antigen ^c					
		rMoPrP23–167	rMoPrP23–214	rMoPrP89–231	rMoPrP155–231	rHaPrPC179A	rHaPrPC214A
I	8(2b), 37(2b), 40(2b), 106(2b), 110(2b), 162(2a)	+	+	–	–	+	+
II	13(2b), 32(2a), 118(2b), 132(G1), 149(2b), 31C6(G1)	+	+	+	–	+	+
III	43C5(G1)	+	+	+	+	+	+
IV	39(2b), 147(2b)	–	–	+	+	+	+
V	66(G1), 31B1(G1), 31B5(G1), 42B4(G1), 42D2(G1), 42D6(G1), 44A2(G1), 44A5(G1), 44B1(2a), 44B5(G1)	–	–	+	+	–	–
VI	23D9(G1), 42D3(G1), 44B2(G1)	–	–	+	–	–	–
VII	72(G1)	+	–	+	–	–	–

^a MAb named only with numbers were obtained by using MoPrP^{Sc} as the immunogen, others named with a combination of numbers and letters were obtained using rMoPrP as the immunogen. Among the latter, mAbs starting with 23 or 31, and 42, 43 or 44 were obtained by immunization with rMoPrP23–231 and rMoPrP89–231, respectively.

^b G1, IgG1; 2a, IgG2a; 2b, IgG2b.

^c Examined by ELISA.

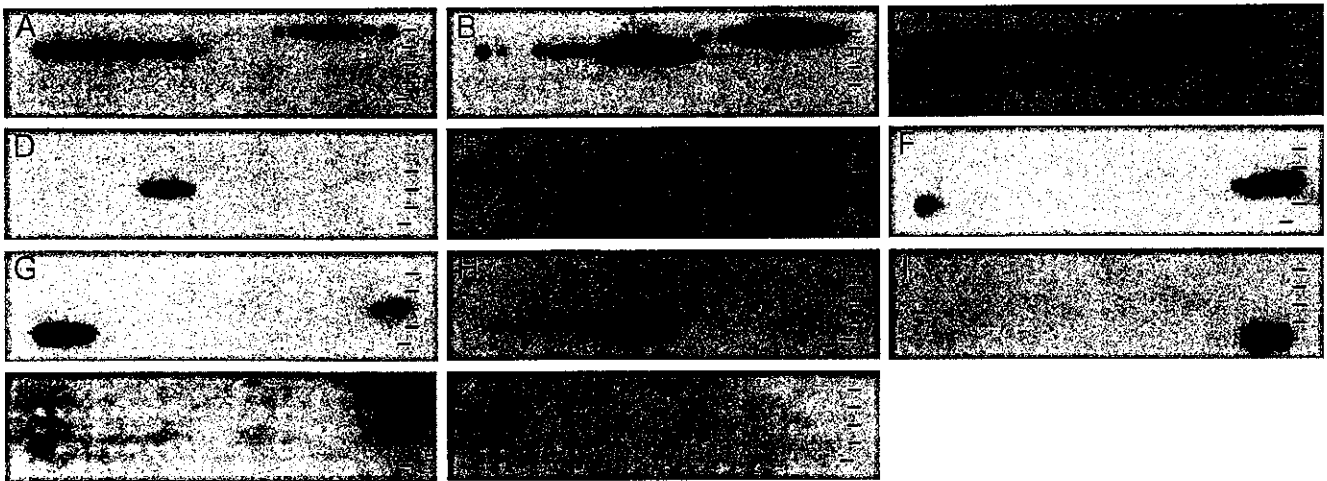


Fig. 2. Pepsin spot analysis. Bars on the right sides indicate lines of peptide spots. The first through fourth lines contain 20 spots per line, while fifth line contains 19 spots. (A) mAb 8 (group I); (B) mAb 110 (group I); (C) mAb 162 (group I); (D) mAb 132; (group IIa); (E) mAb 118 (group IIb); (F) mAb 31C6 (group IIc); (G) mAb 32 (group IId); (H) mAb 43C5 (group III); (I) mAb 147 (group IV); (J) mAb 72 (group VII); (K) mAb P1-284 (anti-parvovirus mAb, negative control).

119–127, AVVGGLGGY (Fig. 2D). mAbs 13 and 118 (group II) reacted with peptides from 55 to 58, which contain the fragment corresponding to residues 137–143, MIHFGND (Fig. 2E). The mAb 31C6 (group II) reacted with peptides from 58 to 61, which share in common residues 143–149, DWEDRY (Fig. 2F). mAbs 32 and 149 (group II) reacted with five peptides from 59 to 63 that share a common sequence RYYRE, residues 147–151 (Fig. 2G). The mAb 43C5 (group III) reacted with 10 continuous spots but intense reactivity was observed to four peptides from 68 to 71, which contain the fragment corresponding to residues 163–169, RPVDQYS (Fig. 2H). This result is consistent with the epitope analysis of mutant recombinant PrPs. mAbs 39 and 147 (group IV) reacted with peptides 98 and 99, which correspond to the extreme C-terminus of PrP molecules, residues 219–229, KESQAYYDGRR (Fig. 2I). The mAbs in groups I–IV reacted with rHaPrPC179A and rHaPrPC214A in the ELISA (Table 1) and PrP^{Sc} in immunoblot analysis (Fig. 3), indicating that these mAbs recognize linear epitopes. mAb 72 appeared to recognize discontinuous epitope based on the reactivity to mutant rPrP (Table 1), although the mAb reacted with peptides 60 and 61, which share residues 143–153 (Fig. 2J).

Based on the fine epitope mapping by pepsin spot analysis, the mAbs in group II of Table 1 can be separated into four groups, designated IIa–IId. Together, the mAbs produced in this study can be divided into at least 10 groups; 7 that recognize linear epitopes, and 3 that recognize discontinuous epitopes (Table 2).

Species specificity of mAbs

We next examined the specificity of the mAbs by ELISA using species-specific versions of rMoPrP, rHaPrP, rShPrP, and rBoPrP. Most of the mAbs reacted with the rPrP from

all four species (hamster, bovine, mouse and ovine), while the following mAbs showed obvious species-specific reactivity: mAbs 13 and 118 in group IIb, mAbs 39 and 147 in group IV, and mAb 66 reacted to Mo and HaPrP, while mAbs 42D2 and 44B5 showed intense reaction to Mo and HaPrP, moderate reaction to ShPrP but no reaction to BoPrP (data not shown).

Fig. 3 shows the reactivity to MoPrP^{Sc}, ovine PrP^{Sc} (ShPrP^{Sc}), and bovine PrP^{Sc} (BoPrP^{Sc}) in immunoblot analysis. mAbs 110, 132, 118, 31C6, 32, 43C5, and 147, which recognize linear epitopes, reacted with PrP^{Sc} prepared from brains of the disease-affected animals. Surprisingly, mAbs 44B1 and 72, which appeared to recognize discontinuous epitopes, showed an intense reaction to PrP^{Sc} in immunoblotting. The species-specific reactivities of mAbs 132, 118, 32, 43C5, 147, 44B1, and 72 are consistent with the results from ELISA; mAbs 118 and 147 only reacted with MoPrP^{Sc} while other mAbs reacted with PrP^{Sc} from the other three species. In contrast to the results from ELISA, mAb 31C6 only reacted with MoPrP^{Sc} and mAb 110 reacted with Mo and ShPrP^{Sc} but not with BoPrP^{Sc} in immunoblot analysis.

Reactivity of panel mAbs to purified PrP^{Sc}

To determine whether any of the antibody-reactive epitopes are exposed in the infectivity-associated PrP^{Sc}, we examined the reactivity of mAbs to purified MoPrP^{Sc} by ELISA. A set of three PrP^{Sc} preparations, PK-untreated and non-denatured, PK-treated and non-denatured, and PK-treated and denatured, was used for each mAb (Fig. 4). All the mAbs reacted with PK-untreated non-denatured PrP^{Sc}, although the reactivity was lost when PrP^{Sc} was treated with PK. However, the mAbs regained reactivity when the PK-treated PrP^{Sc} was denatured with GdnHCl. These results suggest that the inability of the antibodies to react to PK-